

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT



別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて  
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed  
with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

1999年 7月22日

願 番 号

Application Number:

平成11年特許願第207913号

願 人

Applicant(s):

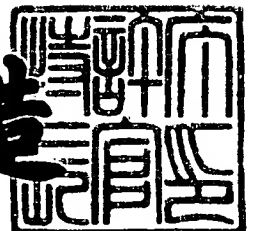
株式会社いかがく

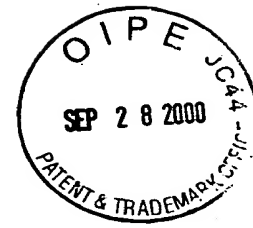


2000年 9月 8日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

及川耕造





【書類名】 特許願

【整理番号】 P990722A

【提出日】 平成11年 7月22日

【あて先】 特許庁長官 伊佐山 建志 殿

【発明者】

【住所又は居所】 京都府京都市伏見区羽東師古川町 3 2 8 番地 株式会社  
いかがく内

【氏名】 内田 壱夫

【発明者】

【住所又は居所】 京都府京都市伏見区羽東師古川町 3 2 8 番地 株式会社  
いかがく内

【氏名】 真柴 新一

【特許出願人】

【識別番号】 000141875

【住所又は居所】 京都府京都市伏見区羽東師古川町 3 2 8 番地

【氏名又は名称】 株式会社いかがく

【代理人】

【識別番号】 100085316

【住所又は居所】 大阪府中央区伏見町 3 丁目 3 番 3 号芝川ビル 2 階 1 号

【弁理士】

【氏名又は名称】 福島 三雄

【電話番号】 06-6202-6117

【選任した代理人】

【識別番号】 100100376

【住所又は居所】 大阪府中央区伏見町 3 丁目 3 番 3 号芝川ビル 2 階 1 号

【弁理士】

【氏名又は名称】 野中 誠一

【電話番号】 06-6202-6117

【選任した代理人】

【識別番号】 100110685

【住所又は居所】 大阪市中央区伏見町 3 丁目 3 番 3 号芝川ビル 2 階 1 号

【弁理士】

【氏名又は名称】 小山 方宜

【電話番号】 06-6202-6117

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 057004

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 血液中の動脈硬化性病変に関わる新規なりボ蛋白の検出方法およびこれに用いる抗体

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 ポリスチレン、ナイロン、ポリブレン、ポリカーボネートなどの高分子化合物を固相法の検出素材として用いるか、コラーゲン、フィブロネクチン、ラミニン、プロテオグリカン類などの細胞外基質成分を固相試薬として用いて、これらに吸着、接着させて検出するようにした動脈硬化性病変に関わる新規なりボ蛋白の検出法。

【請求項 2】 LDLもしくは酸化LDLとフィブリノーゲン（フィブリノーゲン分解物を含む）の複合体、LDLもしくは酸化LDLとフィブリン（フィブリン分解産物を含む）の複合体を測定対象とする請求項1に記載の動脈硬化性病変に関わる新規なりボ蛋白の検出法。

【請求項 3】 LDLとフィブロネクチンの複合体、もしくは酸化LDLとフィブロネクチンの複合体を測定対象とする請求項1に記載の動脈硬化性病変に関わる新規なりボ蛋白の検出法。

【請求項 4】 固相法、酵素免疫法、ラテックス凝集反応、免疫発光分析法、イムノクロマト法などの免疫学的測定法を用いる請求項1、2ないし請求項3のいずれかに記載の動脈硬化性病変に関わる新規なりボ蛋白の検出方法。

【請求項 5】 抗ヒトフィブリノーゲン抗体と、酵素をはじめとする標識物質を標識した抗ヒトApoB抗体などの免疫反応検出試薬を用いる請求項2に記載の動脈硬化性病変に関わる新規なりボ蛋白の検出方法。

【請求項 6】 抗ヒトフィブロネクチン抗体と、酵素をはじめとする標識物質を標識した抗ヒトApoB抗体などの免疫反応検出試薬を用いる請求項3または請求項4に記載の動脈硬化性病変に関わる新規なりボ蛋白の検出方法。

【請求項 7】 マウス骨髓腫細胞と、LDL／フィブロネクチン複合体で免疫された哺乳類の脾臓細胞とを融合させて得られるハイブリドーマにより産生されるモノクローナル抗体であって、nativeなフィブロネクチンやApoB（nativeおよび変性ApoB）には反応せず、LDL／フィブロネクチン複合体を特異的に認識するモ

ノクローナル抗体。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】

この発明は、血液中に存在するApoB蛋白を含有するリポ蛋白のうち、ポリスチレンやポリプロピレン、ナイロンなどの高分子化合物、もしくはコラーゲン、フィブロネクチン、ラミニン、プロテオグリカンなどの細胞外基質成分に吸着、接着性を示すことを特徴とする動脈硬化性病変に関わる新規なりポ蛋白、さらには、フィブリノーゲン、フィブリンもしくはそれぞれの分解物と結合した状態で存在するか、または、フィブロネクチンと結合した状態で存在する動脈硬化性病変に関わる新規なりポ蛋白を特異的に検出する検出方法およびその抗体に関する。

【0002】

【発明が解決しようとする課題】

動脈硬化症は大動脈、冠状動脈、脳動脈および頸動脈に多く発生し、心筋梗塞、脳梗塞などの主因となる疾患である。従来、血液中でこれらの生体内での動脈硬化症の状態を直接反映する測定対象がなく、血清中あるいは血漿中のLDL、リポ蛋白(a)、レムナントリポ蛋白、酸化LDLなどが血管壁脂質蓄積と関わりの深い、動脈硬化性病変に関わる新規なりポ蛋白として測定されてきた。なかんずく、酸化LDLと粥状動脈硬化病変の進展との関連性がスタインバーグ(Steinberg, D. et al. Engl. J. Med. 320: 915, 1989)らにより指摘されて以来、動脈硬化の進展における酸化LDLの関与が注目されてきた。

【0003】

その後、スカベンジャー受容体(Kodama T, et al. Nature 343: 531, 1990)など酸化を受けたLDLに対する受容体の存在が明らかにされ、酸化LDLがこれらの受容体を介して、マクロファージに取り込まれることによって、泡沫細胞となり粥腫形成のきっかけとなるという仮説、また、酸化LDLが血管内皮細胞を障害することで、血小板の粘着凝集や白血球の遊走集結、血漿成分の血管内壁への浸潤がおこり、さらには血管平滑筋細胞の内膜への遊走や増殖を促進する作用も伴い、複雑な病変に進行し、血管の内腔を狭めるという仮説が提唱されている。

【0004】

この酸化LDLが動脈硬化病巣に存在するか否かについての検討は、Herberlandら、Science241:215, 1988. や、Yla-Herttulaら、Clin. Invest. 84:1086, 1989. らが、マロンジアルデヒドを用いて人工的に修飾したLDLを抗原として得た抗体で動脈硬化病巣部が染色されることを確認している。一方、血液中の酸化LDLと疾病との関わりについては未だ明確になっていないのが現状である。本発明者らが先に発見した酸化LDL/ $\alpha$ 1アンチトリプシン複合体（特許出願番号平8-317162号）や、Itabeら、J. Biol. Chem. 269:15274, 1994. の方法による血液中酸化LDL濃度と各種循環器系疾患の進展状態との関連性については、現在検討が進められている。

【0005】

一方、Williamsらにより（Arterioacler. Trom. , 15:551, ）新たな動脈硬化発症機序仮説として、血管内皮下の脂質沈着を発端とする機序仮説が提唱されている。この場合のマクロファージの作用や平滑筋細胞の形質転換後の食細胞化は、過剰の脂質が局所に蓄積しないための生体の防御反応であるとも考えられている。従って、このような局所（血管内壁下）における生体の防御反応が破綻をきたした時、動脈硬化症の進展がおこると考えられている。さらに、近年の疫学調査によれば、血漿フィブリノーゲン値は、虚血性心疾患、脳卒中、抹消動脈硬化性疾患の独立した危険因子として注目されている（Ernstら、Arterioscler Tromb Vasc Biol. , 15:1263, 1995. Lavensonら、Ann Int Med. , 118:956, 1993）。最近、動脈硬化の発症進展に関して、LDLに関する生化学的、分子生物学的研究の進歩が大きく、酸化LDLがatherogenicityの主役であることが強調されすぎているきらいがあるが、動脈壁に滲み込む血漿成分には、LDLのみではなく、フィブリノーゲン、フィブリンおよびそれらの分解産物などがあり、動脈壁細胞の凝固線溶系因子の産生放出を含めて、それらがatherogenesisに重要な役割を果たしていることも指摘されている（Smithら、Thrombosis Research. , 73:1, 1994. 田中健蔵、日本老年医学会雑誌. , 35:880, 1998）。このような状況下で本発明者らは、血液中に血管内皮下の脂質沈着を発端とする機序仮説を裏付けるような、もっと粥状動脈硬化病巣の進展と深く関わるタイプ（Lp（a））のご

とく、強力に細胞外基質成分へ結合する性質を有する)のLDLもしくは酸化LDLが存在するのではないか、さらに細胞外基質蛋白に結合する性質を有するリポ蛋白が、平滑筋細胞の増殖やmigrationの促進にも関わる可能性があると考え、鋭意研究を進めた。

すなわち、本研究は、粥状動脈硬化病巣の進展と深く関わる新規なりポ蛋白を発見し、これを有効に検出する方法を提供することを課題とする。

【0006】

【課題を解決するための手段】

血中に増加したLDLが粥状動脈硬化を惹起する分子機構については、いまだ不明な点が多く残されているが、本発明者は、種々の研究と検討の結果、循環血液中に存在するLDLが多様な特性を有することに気付き、そのなかから血管壁への脂質蓄積性に富む、つまり、細胞外基質成分への沈着性の強い、新規なりポ蛋白の存在を発見して本発明に至った。すなわち、本発明者は、粥状動脈硬化病巣の進展と深く関わる特性を有する新規なLDL (LDL/フィブリノーゲン複合体や酸化LDL/フィブロネクチン複合体として存在しているものや、LDL/フィブリノーゲン (又はその分解産物) 複合体、酸化LDL/フィブリノーゲン (又はその分解産物) 複合体、もしくはLDL/フィブリン (又はその分解産物) 複合体、酸化LDL/フィブリン (又はその分解産物) 複合体を含む、新規な動脈硬化性病変に関わるリポ蛋白) を発見した。この新規リポ蛋白は酸化LDLがatherogenecityの主役とする説、片や凝固線溶系因子がatherogenecityの主役とする説の接点に位置する物質であり、これらの検出方法を確立して本発明を完成させた。

【0007】

より具体的には、本発明は、ポリスチレン、ナイロン、ポリプロピレン、ポリカーボネートなどの高分子化合物を固相法の検出系素材として用いるか、コラーゲン、フィブロネクチン、ラミニン、プロテオグリカン類などの細胞外基質成分を固相試薬として用いて、これらに吸着、接着させて検出するもしくは、新規リポ蛋白がフィブリノーゲンを始めとする関連成分やフィブロネクチンと複合体を形成している場合には該抗体を用いる動脈硬化性病変に関わる新規なりポ蛋白の検出方法である。

本発明に係わる動脈硬化性病変に関係性の強い新規なりポ蛋白は、ポリスチレンなどの高分子化合物や、コラーゲンなどの細胞外基質成分に結合性を有し、これを高感度かつ定量的に検出できることは本発明者によって確認されており、従って、本発明によれば、心筋梗塞や狭心症などの冠動脈疾患、脳梗塞をはじめとする脳動脈系疾患や腎動脈系疾患、末梢動脈系疾患などの粥状硬化症を主因とする種々の循環器系疾患の診断を有効に実現することができる。

## 【0008】

本発明において好適な測定対象は、上記高分子化合物や細胞外基質成分に結合、接着性を示す物質のうち、血液中に存在するApoB蛋白を含有するリポ蛋白であり、より好適には、LDL／フィブリノーゲンもしくはフィブリン（又はそれぞれの分解物）複合体ないしは、酸化LDL／フィブリノーゲンもしくはフィブリン（又はそれぞれの分解産物）複合体、LDL／フィブロネクチン複合体ないしは酸化LDL／フィブロネクチン複合体（以下、LDLないしは酸化LDL－フィブロネクチン複合体のように略記することがある）である。

## 【0009】

また、本発明は、酸化LDL－フィブロネクチン複合体を抗原として用いることを特徴とする抗ヒトLDL－フィブロネクチン複合体モノクローナル抗体にも関する。すなわち、請求項7に記載の通り、本発明は、マウス骨髄腫細胞と酸化LDL－フィブロネクチンで免疫された哺乳類の脾臓細胞とを融合させて得られるハイブリドーマにより産生される抗ヒト酸化LDL－フィブロネクチン複合体モノクローナル抗体であって、LDLもしくは酸化LDL－フィブロネクチン複合体を特異的に認識する抗体である。

この抗体を用いれば、LDLもしくは酸化LDL－フィブロネクチン複合体を測定対象として動脈硬化性病変に関わる新規なりポ蛋白を確実に検出することができる。

## 【0010】

本発明はさらに、血清、血漿および、これらから分離したLDL画分を至適な濃度に希釈した後、ポリスチレンやナイロン、ポリプロピレン、ポリカーボネート等の高分子化合物、もしくはコラーゲン、フィブロネクチン、ラミニン、プロテ



オグリカン等の細胞外基質蛋白質を固相試薬とした系や、該抗体と接触させて、結合したLDLないしは酸化LDL／フィブリノーゲンもしくはフィブリン（又はそれぞれの分解産物）複合体、さらには該抗体と接触させ、結合したLDLないしは酸化LDL－フィブロネクチン複合体を含むこれらの固相ないしは固相試薬でトラップされたりポ蛋白を、さらにLDLを認識する抗体（抗ヒトApoB抗体）と接触させることによって、血液中の動脈硬化性病変に関わる新規なりポ蛋白を測定することができ、動脈硬化性疾患の診断などに好適である。

## 【0011】

## 【実施例】

以下、本発明に至る経緯も含めて具体的に説明する。

## 1. 本発明に至る経緯

本発明者は、細胞外基質成分への沈着性の強い、新規なりポ蛋白の存在を発見した後、*in vitro*において、LDLとフィブリノーゲンおよびLDLとフィブロネクチンの複合体形成を試み、人工的に酸化変性を受けたLDLにより複合体が形成されることを確認した。即ち、*native* LDL、糖化LDLおよび、酸化LDLに精製品フィブリノーゲン又はフィブロネクチンを添加し、いずれのLDLがフィブリノーゲン又はフィブロネクチンと複合体を形成するかを検討した。各LDLとフィブリノーゲン又はフィブロネクチンの混合試料をアガロース電気泳動後、ファットレッド（Fat red）7Bによる脂質染色およびイムノブロット（immunoblot）法によるフィブリノーゲン又はフィブロネクチン染色を行った。

## 【0012】

その結果、*native* LDLおよび糖化LDLとフィブリノーゲン又はフィブロネクチンの混合試料では複合体形成を認めなかったが、血管内皮細胞処理か硫酸銅処理により調整した酸化LDLとフィブリノーゲン又はフィブロネクチンの混合試料では複合体（酸化LDL－フィブリノーゲン複合体、酸化LDL－フィブロネクチン複合体）の形成を認めた。さらに、糖尿病や心筋梗塞患者血清を用いて、超遠心分離により得たLDL（ $1.006\text{g/ml} < d < 1.063\text{g/ml}$ ）を抗ヒトフィブロネクチンイムノアフィニティクロマト手法によって、LDL－フィブリノーゲン複合体、LDL－フィブロネクチン複合体を単離精製した。このLDL－フィブリノーゲン複合体、L

LDL-フィブロネクチン複合体を形成するLDLの性質として、酸化LDLに特徴的な脂質過酸化物の増加、ApoB蛋白の崩壊、そしてLDL粒子全体の陰性荷電の増加を認めた。さらに、ゲル濾過分析にて得た各画分を用いたELISAから、LDL画分中にLDL-フィブリノーゲン複合体、LDL-フィブロネクチン複合体の存在が確認された。

【0013】

そこで本発明者らは、LDLないしは酸化LDLがフィブロネクチンという好都合な標識を付けて存在する事実に着目し、酸化LDLと複合体を形成するフィブロネクチンを特異的に認識するモノクローナル抗体を作製できれば、この抗体を用いて血液中のLDLないしは酸化LDLとフィブロネクチンの複合体を認識、測定、単離精製することが可能と考えた。

抗体作製時の抗原には、人工的に調整した酸化LDL-フィブロネクチン複合体を用いた。得られた抗体のフィブロネクチンに対する反応特異性は、nativeフィブロネクチンには反応性を示さないが、酸化LDLと複合体を形成するフィブロネクチンを認識した。また、本抗体はApoB蛋白は認識しないことも判明した。

【0014】

2. 抗ヒト酸化LDL結合フィブロネクチンモノクローナル抗体の作製法

続いて、モノクローナル抗体作製法の一例について詳細に説明しておく。

〔抗原の調整〕

ヒト血清から超遠心分離により得たLDL ( $1.006\text{g/ml} < d < 1.063\text{g/ml}$ ) を抗ヒト $\alpha 1$ アンチトリプシンポリクローナル抗体を用いたイムノアフィニティーカラムを通し、LDL- $\alpha 1$ アンチトリプシン複合体を除去する。この $\alpha 1$ アンチトリプシンフリーのLDLに精製ヒトフィブロネクチンを添加し、硫酸銅液を加え、37℃に1夜放置して、酸化LDL-フィブロネクチン複合体を形成させた。

LDLとフィブロネクチンの複合体形成の確認は、複合体を試料としてゲル濾過分析により得た各画分についてELISA（固相抗体として抗ヒトフィブロネクチン抗体、酵素標識抗体に抗ヒトApoB抗体を用いる。）を実施することにより確認できる。

【0015】

〔動物への免疫〕

この複合体（抗原）をリン酸緩衝生理食塩水で蛋白濃度として1mg/ml溶液となるように調整し、この溶液をフロインドアジュバンドを等量混合して得られるエマルジョンを、6週令のマウス（Balb/C系マウス）の腹腔内に500  $\mu$  l投与した。この作業を2週間おきに計3回免疫を行った。

〔細胞融合〕

最終免疫後4日目に、このマウスの脾臓から採取した脾リンパ球細胞をマウス骨髓腫細胞（P3-X63-Ag8-U1）と融合させた。

融合方法は、常法に従い、50%ポリエチレングリコール4000溶液を融合促進剤として用い、融合促進剤の添加、混合および希釈の各操作からなる融合時間を10分間、37℃で行った。次に、HAT培地（ヒポキサンチン・チミジン・10%ウシ胎児血清を含むRPMI培地）を各ウェルに分注し、2～3日後、抗体産生ハイブリドーマの選択を行った。

選択方法は、酸化LDL-IgA複合体、native IgA、native apoBを各々固定化した96穴マイクロプレートに、各ウェルのハイブリドーマ形成コロニーの培養上清を100  $\mu$  l分注して反応させ、ついで洗浄後、ペルオキシダーゼ標識抗マウスイムノグロブリン抗体を100  $\mu$  l添加して、抗原抗体反応させ、洗浄、呈色とELISAの常法に従って操作し、目的とする抗体（酸化LDL結合フィブロネクチンに反応性を示すが、nativeフィブロネクチン、native apoBには反応しない抗体）産生ハイブリドーマを複数個選択した。次に、目的とする抗体産生を示したコロニーを回収し、限界希釈法によってハイブリドーマの単一コロニーを得るようにクローニングを行った。この方法は、回収したコロニーをHT培地で希釈し、96穴マイクロプレートの各ウェルにハイブリドーマがウェル当たり1個以下となるようにフィーダー細胞と共に散布した。以上の操作を2回行い、モノクローン化された抗ヒト酸化LDL結合フィブロネクチン抗体産生ハイブリドーマを複数個得た。

【0016】

〔抗ヒト酸化LDL結合フィブロネクチンモノクローナル抗体の腹水化〕

8週令のマウス（Balb/C系マウス）の腹腔内にプリスタン（免疫抑制剤）を投与した。3～7日後に抗体産生ハイブリドーマを腹腔内に投与し、約7日後にマウ

ス腹腔から腹水化された抗体を回収した。

〔抗体の精製〕

腹水化して得られたそれぞれの抗体を50%硫酸アンモニウムで2回塩析分離を行い、リン酸緩衝生理食塩液にて透析して精製し、複数個の抗ヒト酸化LDL結合フィブロネクチンモノクローナル抗体と人工的に調整した酸化LDL-フィブロネクチン複合体をそれぞれ反応させ、二次抗体として抗ヒトApoB酵素標識抗体を用いたELISAにおいて感度に優れた、抗ヒト酸化LDL結合フィブロネクチンモノクローナル抗体（OFN-1と命名）を選定した。

【0017】

3. 本発明によれば、被検体の血液成分を本発明の抗体と接触させ、該抗体と特異的に反応した抗原量を定量することにより、血液中に含まれるLDLないしは酸化LDL-フィブロネクチン複合体を測定することができる。測定法はラジオイムノアッセイ、酵素免疫法、イムノブロット法、免疫沈降法、蛍光イムノアッセイ、化学若しくは生物発光イムノアッセイなどの公知法によって行われる。

酵素免疫法（ELISA）によるLDLないしは酸化LDL-フィブロネクチン複合体の測定法を例にとり、以下に具体的に説明する。

【0018】

〔マイクロプレートへの抗体の固定化〕

マイクロプレート（NUNC社製）の各ウェルに、抗ヒト酸化LDL結合フィブロネクチンモノクローナル抗体（OFN-1） $5\mu\text{g}/\text{ml}$ を含む0.1Mトリス緩衝液（pH8.4）を $100\mu\text{l}$ ずつ分注し、一夜4℃で放置して抗体を固相に吸着させる。

〔酵素標識抗体の調整〕

別途、抗ヒトApoBポリクローナル抗体、あるいは抗ヒトApoBモノクローナル抗体（酸化LDLを抗原として作製したもの）をペプシンと2-メルカプトエタノールアミンによりFab' に標識して酵素標識抗体を調整する。

【0019】

〔血清中あるいは血漿中LDLないしは酸化LDL-フィブロネクチン複合体の測定〕

各ウェルに $100\mu\text{l}$ の1%ウシアルブミンを含むトリス緩衝液（0.1M、pH8.0）を分注、次いで血清もしくは血漿 $50\mu\text{l}$ を加えて混和した後、37℃で2時間反応さ

せる。次に洗浄液（Tween20を終濃度0.005%含むリン酸緩衝液：0.02M：pH7.4）で3回洗浄する。

その後、ペルオキシダーゼ標識抗ヒトApoB Fab' 抗体溶液（1%ウシアルブミンを含むトリス緩衝液）を各ウェルに100  $\mu$  l ずつ加え混合した後、37℃で1時間反応させ、先と同様に3回洗浄する。

基質発色液は、1.66mM TMBZ（同仁化学）をメタノールで溶解後、メタノール濃度が50%になるように0.2Mトリス緩衝液を加えた基質溶液と、0.02%過酸化水素を含む35mMクエン酸溶液とを等量ずつ混和した溶液100  $\mu$  l を各ウェルに加え、室温で10分間放置後、反応停止液（2.5Mリン酸溶液）100  $\mu$  l を各ウェルに加える。

マイクロプレート用比色計を用いて450/630nmの波長で比色し吸光度を算出する。人工的に調整した酸化LDL-フィブロネクチン複合体を上述と同様の操作にて反応させ、作製した検量線から試料中のLDLないしは酸化LDL-フィブロネクチン複合体濃度を算出する。

#### 【0020】

4. また、本発明によれば、LDLもしくは酸化LDLとフィブロネクチン複合体を含む動脈硬化性疾患に関わる新規なりポ蛋白は、細胞外基質成分に対して沈着性が強力であることから、固相に細胞外基質蛋白を固定化し、この蛋白に結合させたLDLないしは酸化LDLとフィブリノーゲンもしくはフィブリン（又はそれぞれの分解産物）との複合体、およびLDLないしは酸化LDLとフィブロネクチンの複合体を含む動脈硬化性病変に関わる新規なりポ蛋白を検出する方法について述べる。固相化に細胞外基質蛋白として、血管をはじめ皮膚、骨、腱、筋などの生体のほとんどすべての組織に存在するコラーゲンをを用いた測定法を例にとり、以下に具体的に説明する。

#### 【0021】

〔マイクロプレートへの細胞外基質蛋白の固定化〕

マイクロプレート（NUNC社製）の各ウェルにI型コラーゲンを10  $\mu$  g/mlを含む0.1Mトリス緩衝液（pH8.4）を100  $\mu$  l ずつ分注し、37℃で放置して蒸発乾固させてコラーゲンを固相に吸着させる。

〔酵素標識抗体の調整〕

別途、抗ヒトApoBポリクローナル抗体、あるいは抗ヒトApoBモノクローナル抗体（酸化LDLを抗原として作製したもの）をペプシンと2-メルカプトエタノールアミンによりFab' として、ペルオキシダーゼをこのFab' に標識して酵素標識抗体を調整する。

【0022】

〔血清中あるいは血漿中のコラーゲン結合性リポ蛋白の測定〕

各ウェルに100 $\mu$ l の1%ウシアルブミンを含むトリス緩衝液（0. 1M、pH8. 0）を分注、次いで血清もしくは血漿50 $\mu$ lを加えて混和した後、37℃で2時間反応させる。次に洗浄液（Tween20を終濃度0. 005%含むリン酸緩衝液：0. 02M：pH7. 4）で3回洗浄する。その後、ペルオキシダーゼ標識抗ヒトApoB Fab' 抗体溶液（1%ウシアルブミンを含むトリス緩衝液）を各ウェルに100 $\mu$ l ずつ加え混和した後、37℃で1時間反応させ、先と同様に3回洗浄する。

基質発色液は1. 66mM TMBZ（同仁化学）をメタノールで溶解後、メタノール濃度が50%になるように0. 2Mトリス緩衝液を加えた基質溶液と、0. 02%過酸化水素を含む35mMクエン酸溶液とを等量ずつ混和した溶液100 $\mu$ l を各ウェルに加え、室温で10分間放置後、反応停止液（2. 5Mリン酸溶液）100 $\mu$ lを各ウェルに加える。

マイクロプレート用比色計を用いて450/630nmの波長で比色し吸光度を測定する。

ヒト血清からコラーゲンを固定化したアフィニティーカラムで単離・精製したコラーゲン結合性リポ蛋白について上述と同様の操作にて反応させ、作成した検量線から試料中のコラーゲン結合性リポ蛋白濃度を算出する。

【0023】

5. さらに、本発明によればLDLか酸化LDLとフィブリノーゲンやフィブリン（又はそれぞれの分解産物）もしくは、フィブロンекチンとの複合体を含む動脈硬化性病変に関わる新規なりポ蛋白はポリスチレンやナイロンなどの高分子化合物に対して結合性が強力であることから、固相法によっても該リポ蛋白を測定することができる。固相にポリスチレン製マイクロプレートを用いた方法を例にとり

、具体的に説明する。

【0024】

〔酵素標識抗体の調整〕

別途、抗ヒトApoBポリクローナル抗体、あるいは抗ヒトApoBモノクローナル抗体（酸化LDLを抗原として作製したもの）をペプシンと2-メルカプトエタノールアミンによりFab'として、ペルオキシダーゼをこのFab'に標識して酵素標識抗体を調整する。

〔血清中あるいは血漿中の動脈硬化性病変に関わる新規なりボ蛋白の固相法による測定〕

無処理のポリスチレン製マイクロプレート（NUNC社製）の各ウェルに100 $\mu$ lの1%ウシアルブミンを含むトリス緩衝液（0.1M、pH8.0）を分注、次いで血清もしくは血漿50 $\mu$ lを加えて混和した後、37℃で2時間反応させる。次に洗浄液（Tween20を終濃度0.005%含むリン酸緩衝液：0.02M：pH7.4）で3回洗浄する。

【0025】

その後、ペルオキシダーゼ標識抗ヒトApoB Fab'抗体溶液（1%ウシアルブミンを含むトリス緩衝液）を各ウェルに100 $\mu$ lずつ加え混和した後、37℃で1時間反応させ、先と同様に3回洗浄する。

基質発色液は1.66mM TMBZ（同仁化学）をメタノールで溶解後、メタノール濃度が50%になるように0.2Mトリス緩衝液とを等量ずつ混和した溶液100 $\mu$ lを各ウェルに加え、室温で10分間放置後、反応停止液（2.5Mリン酸溶液）100 $\mu$ lを各ウェルに加える。マイクロプレート用比色計を用いて450/630nmの波長で比色し吸光度を算出する。ヒト血清からコラーゲンを固定化したアフィニティーカラムで単離・精製したLDLか酸化LDLとフィブリノーゲンやフィブリン（又はそれぞれの分解産物）との複合体、LDLもしくは酸化LDL-フィブロネクチン複合体を含む動脈硬化性病変に関わる新規なりボ蛋白を上述と同様の操作にて反応させ、作成した検量線から試料中の該なりボ蛋白濃度を算出する。

また、本発明によればLDLもしくは酸化LDLとフィブリノーゲンもしくはフィブリン（又はそれぞれの分解産物）との複合体を含む動脈硬化性病変に関わる新規なりボ蛋白の検出方法についても以下に具体的に説明する。

〔マイクロプレートへの抗体の固定化〕

マイクロプレート（NUNC社製）の各ウェルに、抗ヒトフィブリノーゲン抗体（DAKO） $5\mu\text{g}/\text{ml}$ を含む $0.1\text{M}$ トリス緩衝液（ $\text{pH}8.4$ ）を $100\mu\text{l}$ ずつ分注し、一夜 $4^{\circ}\text{C}$ で放置して抗体を固相に吸着させる。

〔酵素標識抗体の調整〕

別途、抗ヒトApoBポリクローナル抗体、あるいは抗ヒトApoBモノクローナル抗体をペプシンと2-メルカプトエタノールアミンによりFab'に標識して酵素標識抗体を調整する。

【0026】

〔血清中のLDLないしは酸化LDL／フィブリノーゲンもしくはフィブリン（又はそれぞれの分解産物）複合体（LDL-フィブリノーゲン関連物質複合体と略記することがある）の測定〕

各ウェルに $100\mu\text{l}$ の1%ウシアルブミンを含むトリス緩衝液（ $0.1\text{M}$ 、 $\text{pH}8.0$ ）を分注、次いで血清 $50\mu\text{l}$ を加えて混和した後、 $37^{\circ}\text{C}$ で1時間反応させる。次に洗浄液（Tween20を終濃度 $0.005\%$ 含むリン酸緩衝液： $0.02\text{M}$ ： $\text{pH}7.4$ ）で3回洗浄する。

その後、ペルオキシダーゼ標識抗ヒトApoB Fab'抗体溶液（1%ウシアルブミンを含むトリス緩衝液）を各ウェルに $100\mu\text{l}$ ずつ加え混合した後、 $37^{\circ}\text{C}$ で1時間反応させ、先と同様に3回洗浄する。

基質発色液は、 $1.66\text{mM}$  TMBZ（同仁化学）をメタノールで溶解後、メタノール濃度が50%になるように $0.2\text{M}$ トリス緩衝液を加えた基質溶液と、 $0.02\%$ 過酸化水素を含む $35\text{mM}$ クエン酸溶液とを等量ずつ混和した溶液 $100\mu\text{l}$ を各ウェルに加え、室温で10分間放置後、反応停止液（ $2.5\text{M}$ リン酸） $100\mu\text{l}$ を各ウェルに加える。

マイクロプレート用比色計を用いて $450/630\text{nm}$ の波長で比色し吸光度を算出する。人工的に調整した酸化LDL-フィブリノーゲン複合体を上述と同様の操作にて反応させ、作成した検量線から試料中のLDL-フィブリノーゲン関連物質複合体濃度を算出する。

【0027】



## 6. LDL画分中に存在するLDL-フィブリノーゲン関連物質複合体、LDL-フィブロネクチン複合体およびコラーゲン結合性LDLの確認

ヒト血清を超遠心分離し、得られたLDL ( $1.006 < d < 1.063 \text{g/ml}$ ) 画分を用いてゲル濾過分析を行い、各フラクションについて以下の如き組み合わせでELISAを実施した。即ち、LDL (抗ヒトApoB/抗ヒトApoB)、LDL/フィブロネクチン複合体 (抗ヒトフィブロネクチン/抗ヒトApoB)、LDL/フィブリノーゲン複合体 (抗ヒトフィブリノーゲン/抗ヒトApoB)、コラーゲン接着性LDL (コラーゲン/抗ヒトApoB) を測定した結果、図1に示すごとくLDL画分中にLDL/フィブロネクチン複合体、LDL/フィブリノーゲン複合体、コラーゲン接着性LDLの存在を認めた。

【0028】

血中Lp (a) 濃度とコラーゲン結合性Lp (a) 濃度の関係および、血中LDL/フィブリノーゲン関連物質との複合体濃度とコラーゲン結合性LDL濃度の関係

細胞外基質成分への結合性を示すが由に動脈硬化症の危険因子とされているLp (a) は、血中のLp (a) 濃度依存性にコラーゲン結合性Lp (a) として検出される。即ち、血中に存在するLp (a) はすべて細胞外基質成分への結合特性を有することが示唆される (図2a)。Cushingらはアポ蛋白 (a) が細胞外基質蛋白と結合しやすい可能性を示唆している (Arteriosclerosis, 9:593, 1989)。LDLではその一部が細胞外基質成分への結合性を示すにすぎず (図2b)、血中のLDL総量から細胞外基質成分結合性のリポ蛋白量を推定することはできない。しかし、血中のLDL/フィブリノーゲン複合体濃度とコラーゲン結合性LDL濃度の相関性は (図2c) のごとく良好であることから、LDL/フィブリノーゲン複合体とコラーゲン結合性LDLは同一物質である可能性が示唆される。従って、LDLが細胞外基質蛋白と結合性を示すのはLDLに結合しているフィブリノーゲン関連蛋白に依存している可能性が示唆される。つまり、血中LDL中にLp (a) と同様の細胞外基質成分結合性のリポ蛋白 (動脈硬化症惹起性リポ蛋白) が存在する。

【0029】

## 7. 健常者血清中のLDL-フィブリノーゲン関連物質複合体濃度の分布

健常者血清中のLDL-フィブリノーゲン関連物質の濃度は図3の如くである。

【0030】

8. 健常者、糖尿病患者およびマルチプルリスクファクター症候群患者血清中のLDL-フィブリノーゲン関連物質複合体量

図4に示すごとく糖尿病患者およびマルチプルリスクファクター症候群患者血清中のLDL-フィブリノーゲン関連物質複合体量は健常者に比べて有意に高値であった。

【0031】

【発明の効果】

以上の通り、本発明によれば、LDLもしくは酸化LDLとフィブリノーゲン（フィブリノーゲン分解産物を含む）の複合体と、LDLもしくは酸化LDLとフィブリン（フィブリン分解産物を含む）の複合体や、LDLもしくは酸化LDLとフィブロネクチンとの複合体を含む細胞外基質成分に結合性を示す動脈硬化性病変に関わる新規なりボ蛋白を測定することによって、心筋梗塞や狭心症などの冠動脈系疾患、脳梗塞や脳血管系痴呆などの脳動脈系疾患、糖尿病性腎症などの動脈系疾患、および、末梢動脈閉塞症などの循環器系疾患を診断することができ有用である。

【図面の簡単な説明】

【図1】

LDL画分中に存在するLDL-フィブリノーゲン関連物質複合体、LDL-フィブロネクチン複合体およびコラーゲン結合性リボ蛋白を示したものである。

【図2】

血中Lp (a) 濃度と細胞外基質蛋白（コラーゲン）結合性Lp (a) 濃度の関係、血中LDL-コレステロール濃度と動脈硬化性病変に関わる新規なりボ蛋白濃度、および、LDL-フィブリノーゲン関連物質複合体濃度とコラーゲン結合性LDL濃度の関係を示したものである。

【図3】

健常者血清中のLDL-フィブリノーゲン関連物質複合体濃度の分布を示したものである。

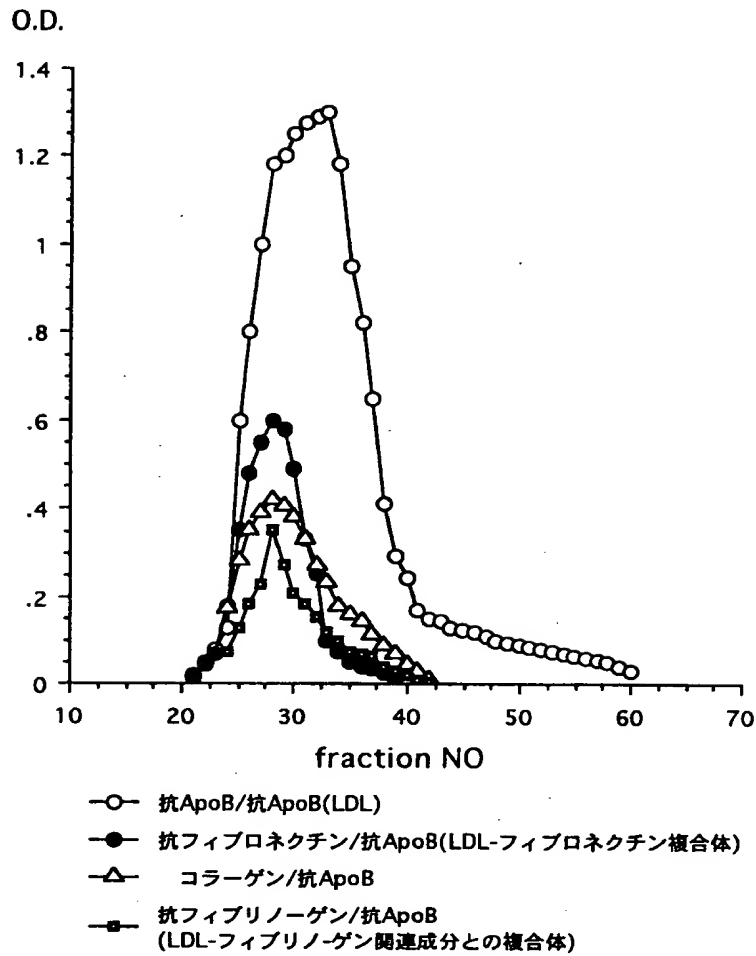
【図4】

健常者、糖尿病患者およびマルチプルリスクファクター症候群患者血清中のLD

L-フィブリノーゲン関連物質複合体量の比較を示したものである。

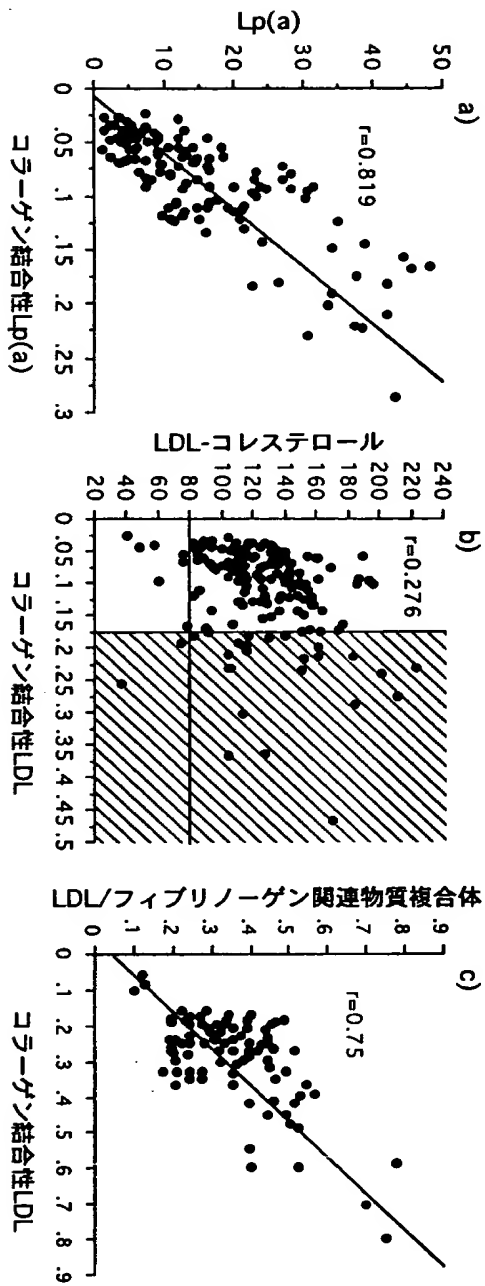
【書類名】 図面

【図 1】



ヒト血清LDL画分中に存在するLDL-フィブリノーゲン関連成分との複合体、LDL-フィブロネクチン複合体およびコラーゲン結合性リポ蛋白

特平11-207913

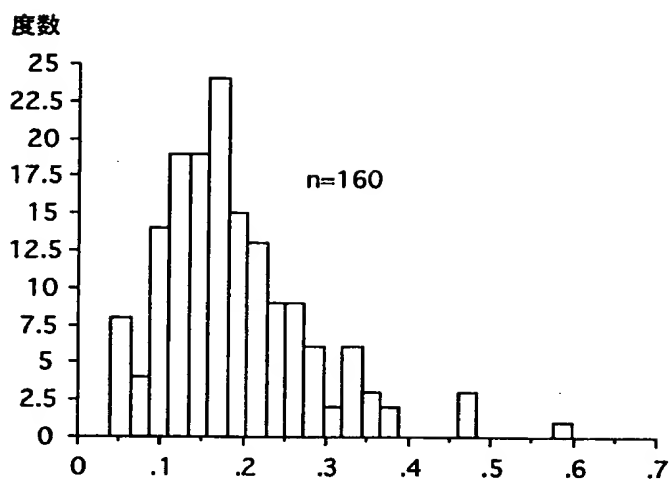


Williamsら (Arterioscler, Tromb., 15: 551, 1995) による新たな動脈硬化発症機序仮説 (血管内皮下の脂質沈着を発端とする機序仮説) では、血中LDLコレステロール濃度が80mg/dl以上になれば血管内皮下に脂質沈着が生ずることを示唆しているが、本発明者らは血中にLp(a)と同様に動脈硬化性疾患に関わる新規ナリポ蛋白 (LDL-フィブリノーゲン関連物質との複合体を含む細胞外基質成分結合性リポ蛋白: コラーゲン結合性LDLなど) が存在することが、血管内皮下における脂質沈着発生に必須であることを見出した。(図2b中、斜線部分に存在する症例が動脈硬化性疾患に関わる新規ナリポ蛋白陽性例)

血中Lp(a)濃度と細胞外基質蛋白 (コラーゲン) 結合性Lp(a)濃度の関係、血中LDL-コレステロール濃度と動脈硬化性疾患に関わる新規ナリポ蛋白濃度、およびLDL-フィブリノーゲン関連成分との結合体濃度とコラーゲン結合性LDL濃度の関係

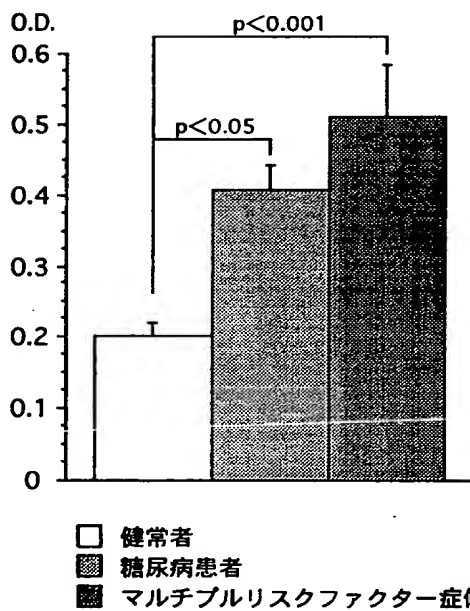
【図2】

【図 3】



健常者血清中のLDL-フィブリノーゲン関連物質複合体濃度の分布

【図 4】



健常者、糖尿病患者、マルチプルリスクファクター症候群におけるLDL-フィブリノーゲン関連物質複合体量の比較

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 動脈硬化性病変に関わる新規なりボ蛋白を検出する新規な方法を提供する。

【解決手段】 ポリスチレン、ナイロン、ポリプロピレン、ポリカーボネートなどの高分子化合物を固相法の検出系素材として用いるか、コラーゲン、フィブロネクチン、ラミニン、プロテオグリカン類などの細胞外基質成分を固相試薬として用いて、これらに吸着、接触させ、もしくは、該抗体を用いて動脈硬化性病変に関わる新規なりボ蛋白を検出する。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	平成11年 特許願 第207913号
受付番号	59900704157
書類名	特許願
担当官	第三担当上席 0092
作成日	平成11年 7月26日

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】	000141875
【住所又は居所】	京都府京都市伏見区羽束師古川町328番地
【氏名又は名称】	株式会社いかがく

【代理人】

申請人

【識別番号】	100085316
【住所又は居所】	大阪府大阪市中心区伏見町3丁目3番3号 芝川ビル2階1号 福島特許商標事務所
【氏名又は名称】	福島 三雄

【選任した代理人】

【識別番号】	100100376
【住所又は居所】	大阪府大阪市中心区伏見町3丁目3番3号 芝川ビル2階1号 福島特許商標事務所
【氏名又は名称】	野中 誠一

【選任した代理人】

【識別番号】	100110685
【住所又は居所】	大阪市中心区伏見町3丁目3番3号 芝川ビル2階1号 福島特許商標事務所
【氏名又は名称】	小山 方宜



出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000141875]

1. 変更年月日 1995年 7月27日

[変更理由] 名称変更

住 所 京都府京都市伏見区羽束師古川町328番地

氏 名 株式会社いかがく